

Title	Mutually regulated expression of caspase-activated DNase and its inhibitor for apoptotic DNA fragmentation
Author(s)	長瀬, 洋子
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46346
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 ^{なが}長 ^せ瀬 ^{ひろ}洋 ^こ子

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20083 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科生体制御医学専攻

学 位 論 文 名 Mutually regulated expression of caspase-activated DNase and its inhibitor for apoptotic DNA fragmentation
(アポトーシス時の DNA 断片化における CAD と ICAD の発現制御)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 長 田 重一

(副査)

教 授 辻 本 賀 英 教 授 米 田 悦 啓

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

アポトーシスは不要な細胞、有害な細胞を取り除く過程である。アポトーシス時の細胞の特徴的な形態変化として、核の凝縮と断片化、染色体 DNA のスクレオソーム単位への切断がある。我々の研究室では、アポトーシス時に活性化される DNase である CAD (caspase-activated DNase) とその阻害蛋白質 ICAD (Inhibitor of CAD) を単離した。通常細胞内では、CAD は ICAD と複合体を形成して不活性化されている。アポトーシス時には、活性化されたカスパーゼで ICAD が切断不活性化され、活性化型 CAD が DNA を分解する。しかしアポトーシスで働く DNase は、他にも報告されている。本研究では、CAD の発現とアポトーシスの DNA 分解での CAD の役割を検討する事を目的とした。

〔 方法ならびに成績 〕

細胞内在性 CAD を特異的に認識できる CAD モノクローナル抗体を作成するために、抗原となる組換えマウス CAD 蛋白質の作成を行った。マウス CAD、ICAD cDNA を挿入した組換え baculovirus を Sf9 細胞に感染させ、CAD/ICAD 複合体を精製後、カスパーゼ 3 で処理して活性化型 CAD を得た。精製した活性化型 CAD をアルメニアンハムスターに免疫し、CAD モノクローナル抗体を作成した。作成した抗体を用いて CAD 蛋白質の発現を検討すると、胸腺、脾臓で強い発現が見られた。CAD の発現とアポトーシスでの DNA 断片化との関連を調べるために、まず CAD 蛋白質の発現が強い脾臓細胞を調製し、ヒト FasL またはスタウロスポリンでアポトーシスを誘導した。染色体 DNA の断片化を解析すると、野生型の脾臓細胞では、ヒト FasL 刺激後 3 時間目には強い DNA の断片化が見られた。一方 CAD 欠失細胞では、細胞死が完全に起こっていると思われる刺激後 24 時間目でも、DNA の断片化は全く見られなかった。スタウロスポリンを用いて細胞死を誘導した場合にも同様の結果が得られた。次に野生型、CAD 欠損マウス及び ICAD 欠損マウスより MEF 細胞株を樹立した。MEF 細胞では、野生型細胞でも CAD 蛋白質の発現はほとんど見られなかった。MEF 細胞をシクロヘキシミド存在下、ヒト FasL で刺激すると、野生型、CAD 欠失細胞いずれも同様の効率で死滅するが、どちらも染色体 DNA の断片化は見られなかった。そこで、MEF CAD 欠失細胞にマウス CAD

発現ベクターを導入し CAD の強制発現株を樹立した。この MEF 細胞では、FasL の刺激により 3 時間以内に顕著な DNA 断片化が誘導された。以上の結果からリンパ球細胞、MEF 細胞では、アポトーシスでの染色体 DNA の断片化を引き起こすのは、CAD 蛋白質のみであり、CAD の発現量が DNA 断片化を制御していると結論した。

ところで、CAD 蛋白質の翻訳過程には ICAD 遺伝子の発現が必須である。ICAD には、alternative splicing により産生される 2 種の分子 (ICAD-L と ICAD-S) が存在する。ICAD 欠失 MEF 細胞に ICAD-L あるいは ICAD-S を発現するベクターを導入し、ICAD の強制発現株を樹立した。これらの細胞での CAD 蛋白質の発現を検討すると、ICAD 欠失細胞及び ICAD-S を強制発現させた細胞では、CAD 蛋白質の発現は全く見られなかったが、ICAD-L を強制発現させた細胞では、顕著な CAD 蛋白質の発現が確認された。ついで、これらの細胞にアポトーシスを誘導すると、ICAD-L を強制発現させた細胞でのみ DNA の断片化が観察され、活性のある CAD 蛋白質が合成されていた。よって、ICAD-L が特異的に CAD の翻訳過程をサポートする、あるいはその安定性を高めていると結論した。一方、CAD 欠失細胞では、ICAD-S 蛋白質の発現量は野生型細胞と変わらなかったが、ICAD-L 蛋白質の発現量が顕著に減少していた。しかし、ICAD-L mRNA の発現量は、野生型と CAD 欠失細胞で差が見られないことから、CAD が ICAD-L の翻訳あるいは、その安定性に影響している事を示唆している。そこで、ICAD-L 蛋白質の発現量の少ない CAD 欠失 MEF 細胞に CAD 発現ベクターを導入した細胞株を樹立した。親株の CAD 欠失 MEF 細胞と比べて CAD を強制発現させた細胞では、ICAD-S 蛋白質の発現量に差は見られなかったが、ICAD-L 蛋白質の発現量が顕著に増加していた。一方、CAD の発現により ICAD-L mRNA の発現は影響されなかった。以上の結果は、CAD 蛋白質が ICAD-L 蛋白質の発現、おそらくその安定性に影響を与えている事を示している。よって、CAD 蛋白質と ICAD-L 蛋白質は互いの蛋白質発現に必要である事が示唆された。

[総 括]

本研究により、アポトーシスでの DNA 断片化を引き起こす分子は CAD が唯一であり、CAD の発現量によって DNA 断片化が制御されていると結論した。また、CAD 蛋白質と ICAD-L 蛋白質は互いの蛋白質発現に必要であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

アポトーシスは不要な細胞、有害な細胞を取り除く過程であり、その特徴として核の凝縮と断片化、染色体 DNA のヌクレオソーム単位への切断がある。この DNA 断片化を引き起こす DNase として、CAD (Caspase-activated DNase) とその阻害蛋白質 ICAD (Inhibitor of CAD) が単離されている。通常細胞内では、CAD は ICAD と複合体を形成して不活性化されている。アポトーシス時には、活性化されたカスパーゼにより ICAD が切断不活性化され、活性化型 CAD が DNA を分解する。しかし、アポトーシスで働く DNase は他にも報告されている。本研究では CAD の発現とアポトーシスの DNA 分解における CAD の役割を検討した。作成した CAD モノクローナル抗体を用いて CAD 蛋白質の発現を検討すると、脾臓、胸腺で強い発現が見られ、アポトーシス誘導後の DNA 断片化の強さとも一致した。一方、CAD 欠失細胞では DNA 断片化は全く検出されなかった。よって、CAD がアポトーシスでの DNA 分解を引き起こす必須の分子であり、CAD の発現量により DNA の断片化が制御されていると結論した。ところで、ICAD には、alternative splicing により産生される 2 種の分子 (ICAD-L と ICAD-S) が存在する。CAD 蛋白質の発現には ICAD-L 蛋白質の発現が必要であり、逆に ICAD-L 蛋白質の発現には CAD 蛋白質の発現が互いに必要である事が示された。

以上本研究では、アポトーシスでの DNA 分解における CAD の役割とその発現制御が示されており、学位論文に値する。